

短 報
Note

ホロホロチョウ雄とニワトリ雌の 異種間雑種における血漿テストステロン濃度の 日内変動

福永一朗*・佐々木剛**・安藤元一**・小川 博**

(平成 23 年 11 月 17 日受付/平成 24 年 4 月 20 日受理)

要約：異種間雑種（ホロホロチョウ雄×ニワトリ雌）および親種（ニワトリ，ホロホロチョウ）を 14L : 10D の照明条件で飼育し，血漿テストステロン濃度の日内変動を明らかにしようとした。採血は，4・8・12・16・20・24 時に連続して行い，血漿テストステロン濃度の測定にはエンザイムイムノアッセイ法を用いた。その結果，雑種，親種（ニワトリ，ホロホロチョウ）の血漿テストステロン濃度の日内変動には有意な差が認められなかった ($p>0.05$)。一方で，雑種の血漿テストステロン濃度（最低値： 4.75 ± 0.37 pg/ml，最高値： 6.14 ± 0.61 pg/ml）は，全ての採血時間において親種であるニワトリ（最低値： 2.76 ± 0.76 ng/ml，最高値： 4.72 ± 0.29 ng/ml）やホロホロチョウ（最低値： 1.25 ± 0.60 ng/ml，最高値： 2.71 ± 1.01 ng/ml）に比べ著しく低い値 ($p<0.05$) を示した。なお，親種（ニワトリ，ホロホロチョウ）間では，テストステロン濃度に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

キーワード：異種間雑種，ニワトリ雄，ホロホロチョウ雄，テストステロン，日内変動

緒 言

希少鳥類の新規増殖法として，生殖系列キメラを用いた手法が検討され，ニワトリにおいて生殖系列キメラを介してドナー種の個体を復元することが可能となっている¹⁾。しかし，この場合生殖系列キメラの生殖巣におけるドナー細胞の割合を高める必要があることから，ホスト種の生殖細胞を減らす必要がある。

一方，鳥類において異種間雑種を作出した場合，雄しか孵化せず孵化した個体も生殖能力をもたない²⁾。このことから，雑種をホストとして用いることで，生殖細胞の寄与率に関係なくドナー由来の配偶子のみを得られる生殖系列キメラの作出が期待される。

しかし，雑種についての繁殖に関する内分泌的な知見は，雑種の精巣が親種に比べて小さいこと^{3,4)} や，血漿テストステロン濃度が親に比べて低いこと⁵⁾ は報告されているものの，テストステロン濃度の日内変動やそれ以外の繁殖に関するホルモンについての報告は見当たらない。

雄鳥において，精巣の発達や性腺刺激ホルモン，テストステロン分泌には密接な関係がある。また，テストステロンの濃度は光周期の支配を受けることが知られている^{6,7)} ことから，家禽の血漿テストステロン濃度の日内変動についてニワトリ⁸⁾，ホロホロチョウ⁹⁾，ニホンウズラ¹⁰⁾ 等で調べられている。しかし，異種間雑種における血漿テストステロン濃度の日内変動についての報告は見当たらない。

そこで本実験では，雑種をホストとした生殖系列キメラ作出に関する研究の第一歩として，異種間雑種（ホロホロチョウ雄×ニワトリ雌）の血漿テストステロンレベルが親種として用いたホロホロチョウ（真珠斑ホロホロチョウ種）とニワトリ（白色レグホーン種）の雄とどのように相違するのかを明らかにするため，血漿テストステロン濃度の日内変動を調べた。

材料および方法

供試したホロホロチョウ（真珠斑ホロホロチョウ種： 50.2 ± 0.86 週齢），ニワトリ（白色レグホーン種： 49.8 ± 0.92 週齢），異種間雑種（真珠斑ホロホロチョウ雄×白色レグホーン雌： 48.0 ± 0.00 週齢）は，本学野生動物学研究室で 14 時間照明（4 時点灯）：10 時間暗黒（18 時消灯），餌・水は自由摂取の条件下で繁殖・維持している個体を用いた。飼料には市販の産卵用ニワトリ飼料（ヘルシー S-セブン：日本農産工業）を用いた。ホロホロチョウとニワトリは，精液が採取でき，体重の増加が認められなくなった個体を，異種間雑種においては，体重の増加が認められなくなった個体のみを用いた。なお，異種間雑種は外見および外部生殖器での性判別が困難であるため，CHD 遺伝子により雄と判別したものをを用いた。

血液は，対象個体を保定し，翼下静脈よりヘパリン処理した注射筒により 1.5 ml を採取した。また，採血は 4・8・12・16 時（明期）と 20・24 時（暗期）に連続して行った。

* 東京農業大学農学研究科畜産学専攻

** 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

Table 1 Profile of Birds

Species	Number of Birds	Body Weight (kg)
White Leghorn	5	1.80±0.04 ^a
WL-GF Hybrid	4	2.04±0.12 ^b
Guinea Fowl	5	2.40±0.04 ^c

The values followed by different letters differ significantly ($p<0.05$).

採取した血液は、遠心分離 ($800\times g$, 4°C , 10 min) により血漿部分と血球部分に分離した。

血漿テストステロン濃度は、エンザイムイムノアッセイ法を用い、テストステロン測定用キット (Testosterone EIA KIT; Cayman Chemical 社) とマイクロプレートリーダー (Emax; Molecular Devices 社) にて吸光度を測定し、フリーソフトである Newcra にて算出した。なお、同一の検体 ($n=5$) を用いて算出した測定内変動係数は、7.5% と 5.1% であり、測定間変動係数は、6.4% であった。

雑種において、テストステロン濃度の値が使用キットの測定下限 (3.9 pg/ml) 以下の場合、その値は除外し統計処理を行った。また、供試個体の体重と測定したテストステロン濃度は、Scheffe's multiple comparison test により統計学的に検討した。

結 果

雑種および親種の体重は、Table 1 に示した。体重は、ホロホロチョウが最も重く、次いで雑種、ニワトリの順に重く、3 種間の体重の値には有意な差が認められた ($p<0.05$)。

雑種の血漿テストステロン濃度 (最低値: $4.75\pm 0.37\text{ pg/ml}$, 最高値: $6.14\pm 0.61\text{ pg/ml}$) は、全ての採血時間において親種であるニワトリ (最低値: $2.76\pm 0.76\text{ ng/ml}$, 最高値: $4.72\pm 0.30\text{ ng/ml}$) やホロホロチョウ (最低値: $1.25\pm 0.60\text{ ng/ml}$, 最高値: $2.71\pm 1.01\text{ ng/ml}$) と比べて有意に低い値を示した ($p<0.05$)。なお、親種 (ニワトリ, ホロホロチョウ) 間では、テストステロン濃度に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

雑種および親種 (ニワトリ, ホロホロチョウ) の血漿テストステロン濃度の日内変動を Fig. 1 に示した。雑種および親種のいずれも、濃度の変動には有意な差が認められなかった ($p>0.05$)。しかし、親種については暗期開始 6 時間後 (0 時) に高く (ニワトリ: $4.72\pm 0.30\text{ ng/ml}$, ホロホロチョウ: $2.71\pm 1.01\text{ ng/ml}$)、明期開始 4 時間後 (8 時) に最も低い値 (ニワトリ: $2.76\pm 0.76\text{ ng/ml}$, ホロホロチョウ: $1.25\pm 0.60\text{ ng/ml}$) を示した。

考 察

本実験に使用した雑種の体重は親種の間となった。この結果は、ニワトリ (白色レグホーン種), ホロホロチョウ (真珠斑ホロホロチョウ), 雑種 (ニワトリ雄×ホロホロチョウ雌) の体重¹¹⁾ と同様の結果であった。

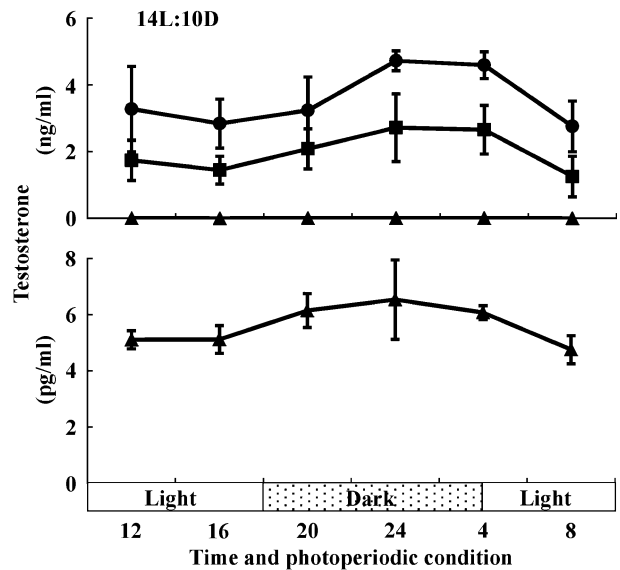


Fig. 1 Diurnal variations in plasma testosterone levels

● : White Leghorn (Number of assay = 5), ■ : Guinea Fowl (Number of assay = 5), ▲ : Guinea Fowl-White Leghorn Hybrid (Number of assay = 3). Each point and vertical bars represent mean \pm SE.

また、本実験の結果から、ホロホロチョウとニワトリの雑種は精巣のテストステロン分泌能が著しく低いことが明らかになった。この結果は、ニワトリ×キジの雑種のテストステロン濃度が $0.68\pm 0.11\text{ ng/ml}$ と親種 (ニワトリ: $155.47\pm 9.03\text{ ng/ml}$, キジ: $24.29\pm 3.47\text{ ng/ml}$) と比べて低い値を示すという報告⁵⁾ と同様の結果であった。一方で、本実験で使用したホロホロチョウ×ニワトリの雑種は、ニワトリ×キジの雑種に比べてもテストステロン濃度が著しく低い値を示した。

親種の組み合わせ [ニワトリ×キジ, アヒル×バリケン, (キンケイ×ギンケイ) ×キジ] により、雑種の精巣の大きさや生殖細胞の発達状況が異なるとの報告がある¹²⁾ ことから、本実験の組み合わせ (ホロホロチョウ×ニワトリ) は、ニワトリ×キジの組み合わせに比べ精巣が発達していない可能性が考えられた。

雄鳥において、精巣の発達や性腺刺激ホルモン、テストステロン分泌には密接な関係がある。精巣からのテストステロン分泌は、脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモンの影響を受けており、黄体形成ホルモン¹³⁾ とテストステロン⁶⁾ はいずれも暗期に上昇するという類似した日内変動を示すことが知られている。また、副腎からもテストステロン分泌されている¹⁴⁾ ことが知られている。

一方で、ニワトリ⁸⁾, ホロホロチョウ⁹⁾, ニホンウズラ¹⁰⁾ において血漿テストステロン濃度が暗期に高く明期に低いという変動を示すことが報告されている。しかし、本研究で使用した親種 (ホロホロチョウ, ニワトリ) は、血漿テストステロン濃度が暗期に高く明期に低い値を示したもののいずれも有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。また、

雑種の血漿テストステロン濃度についても相対的に著しく低い値で推移し、変動においても有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

以上のことから、雑種の血漿テストステロン濃度が低い理由として、精巣が未発達で分泌能を持たないか著しく低い可能性、本実験で測定されたテストステロンは副腎由来である可能性、精巣に対する性腺刺激ホルモンの分泌が正常に行われていない可能性等が考えられたが、本実験の結果からはその理由を明らかにすることはできない。

今後は、雑種と親種における精巣の組織像の解析、その他のホルモンに対する反応性等の調査が望まれる。

引用文献

- 1) KUWANA, T., KAWASHIMA, T., NAITO, M., YAMASHITA, H., MATSUZAKI, M and TAKANO, T (2006) Conservation of a Threatened Indigenous Fowl (Kureko Dori) Using the Germ-line Chimeras Transplanted from Primordial Germ Cells. *J. Poult. Sci.* **43** : 60-66.
- 2) HALDANE, J.B.S (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* **12** : 101-109.
- 3) SHAKLEE, W.E and KNOX, C.W (1954) Hybridization of the pheasant and fowl. *J. Hered.* **45** : 183-190.
- 4) YAMASHINA, MARQUIS Y (1943) Studies on sterility in hybrid birds. : IV. cytological researches on hybrids in the family phasianidae. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.* **8** : 307-380.
- 5) PUROHT, V.D, BASRUR, P.K and SMITH, V.G. (1978) Testosterone levels in the blood plasma of male chicken-pheasant hybrids. *Poult. Sci.* **57** : 513-517.
- 6) 加藤 勝 (1974) 現代動物学の課題 (2) 環境と内分泌. 東京大学出版会, 東京, pp. 137-162.
- 7) 本間運隆 (1982) 鳥類の生殖腺活性リズムと光感受性. 蛋白核酸酵素. **27** : 277-288.
- 8) SCHANVACHER, B.D, GOMES, W.R and VANDEMARK, N.L (1974) Diurnal rhythm in serum testosterone levels and thynidine uptake by testes in the domestic fowl. *J. Anim.. Sci.* **38** : 1245-1248.
- 9) OGAWA, H., KUWAYAMA, T and ICHINOE, K (1993) Diurnal variations in plasma testosterone level in the male Guinea Fowl. *Jour. Agri. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku.* **38** : 112-115.
- 10) 桑山岳人, 田中克英 (2005) ニホンウズラ雄の血漿テストステロン濃度の日内変動. 東京農業大学農学集報. **50** : 46-48.
- 11) 高橋利男 (1981) 人工授精によるニワトリとホロホロ鳥の雑種について. 広島農短大報. **6** : 493-500.
- 12) 山階芳麿 (1943) 鳥類雑種の不妊性に関する研究 : IV. 鳥類雑種の脳下垂体前葉の細胞学的研究. 北海道帝国大学理学部紀要. **9** : 77-84, 1943.
- 13) SCANES, C.G., CHADWICK, A., SHARP, P.J and BOLTON, N.J (1978) Diurnal variation in plasma luteinizing hormone levels in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **34** : 45-49.
- 14) TANABE, Y., NAKAMURA, T., FUJIOKA, K and DOI, O (1979) Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocr.* **39** : 26-33.

Diurnal Variations in Plasma Testosterone Level in the Male Guinea Fowl-Chicken Hybrids

By

Ichiro FUKUNAGA*, Takeshi SASAKI**, Motokazu ANDO** and Hiroshi OGAWA**

(Received November 17, 2011/Accepted April 20, 2012)

Summary : Testosterone levels in the blood plasma of sterile male guinea fowl-chicken hybrids were compared with plasma testosterone levels of cocks and male guinea fowls, using enzyme immunoassay. Daily lighting schedule was 14L : 10D and blood sampling time was 4 : 00 a.m., 8 : 00 a.m., 12 : 00 p.m., 4 : 00 p.m., 8 : 00 p.m., and 12 : 00 a.m. Values of testosterone for cocks were : (Highest value : 2.76 ± 0.76 ng/mL, Lowest value : 4.72 ± 0.30 ng/mL), male guinea fowls (Highest value : 1.25 ± 0.60 ng/mL, Lowest value : 2.71 ± 1.01 ng/mL) and guinea fowl-chicken hybrids (Highest value : 4.75 ± 0.37 pg/mL, Lowest value : 6.14 ± 0.61 pg/mL). Diurnal variations in testosterone level were not significantly different ($p > 0.05$) in hybrids, cocks and male guinea fowls. On the other hand, hybrid testosterone level was significantly lower ($p < 0.05$, order was 1/1000) than that of cocks and male guinea fowls in each sampling time. And testosterone level was not significantly different ($p > 0.05$) between cocks and male guinea fowls.

Key words : Male Hybrid, Male Chicken, Male Guinea Fowl, Testosterone, Diurnal variation

* Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Human and Animal-Plant Relationships, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture